

POTENSI SITOTOKSISITAS EKSTRAK BAKTERI ASOSIASI *Flavobacterium* sp. DARI KARANG KERAS *Acropora muricata* YANG TERINFEKSI PENYAKIT BrB (*BROWN BAND*)

Widyastuti^{1*}, Shinta Werorilangi¹, Arniati Massinai¹, Akbar Tahir¹

¹Jurusan Ilmu Kelautan, Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan, Universitas Hasanuddin

*email : widyastuti160@gmail.com

Abstrak

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui potensi sitotoksitas bahan aktif bakteri asosiasi dari karang keras yang terinfeksi penyakit *Brown Band Disease* dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) atau menggunakan *Artemia salina*. Penelitian ini menggunakan 360 ekor larva *Artemia salina* yang dibagi menjadi 3 kelompok jenis ekstrak bakteri. Konsentrasi ekstrak bakteri, masing-masing terdiri dari 10 ekor larva *Artemia salina* dengan replikasi 3 kali untuk kelompok seri konsentrasi ekstrak. Kelompok perlakuan ekstrak bakteri terdiri dari konsentrasi 10 ppm, 100 ppm, dan 1000 ppm. Data kematian *Artemia salina* dianalisis dengan menggunakan analisis EPA probit versi 1,5 untuk mengetahui nilai LC_{50} . Hasil penelitian ini menunjukkan nilai LC_{50} yang berbeda-beda dari setiap jenis ekstrak bakteri yang berasosiasi dengan karang sehat dan karang yang terinfeksi BrB. Nilai LC_{50} masing-masing ekstrak bakteri sebagai berikut ; ekstrak bakteri karang sehat jenis *Bacillus* sp. konsentrasi LC_{50} nya berada pada 183,7 ppm, *Chromobacterium* sp. sebesar 4969,5 ppm dan jenis bakteri dari karang yang terinfeksi yaitu *Flavobacterium* sp. adalah 109,9 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak bakteri yang berasosiasi dengan karang sehat dan karang yang terinfeksi penyakit BrB memiliki potensi sitotoksik yang berbeda terhadap *Artemia salina* berdasarkan metode BSLT, namun ekstrak bakteri yang memiliki daya racun yang tertinggi berasal dari bakteri asosiasitif karang yang terinfeksi penyakit sebab nilai LC_{50} yang didapatkan <1000 ppm (109,9 ppm).

Kata Kunci : Sitotoksitas, Bahan Aktif Bakteri Asosiasi Karang, *Artemia salina*, BSLT, LC_{50} .

Pendahuluan

Bakteri asosiasi pada umumnya melindungi biota yang ditumpanginya dan dirinya dengan menghasilkan senyawa aktif yang merupakan golongan senyawa dengan struktur bervariasi dan khas untuk setiap organisme, memiliki berat molekul relatif kecil dan ditemukan dalam jumlah minor. Senyawa aktif pada suatu organisme akan dikeluarkan ketika organisme tersebut mengalami stress atau ancaman dari lingkungan maupun organisme lainnya. Potensi bahan aktif bakteri asosiasi terhadap karang yang terinfeksi penyakit seperti *Brown Band* diindikasikan memiliki kandungan metabolit sekunder yang lebih besar dibandingkan dengan bakteri asosiasi karang yang sehat, hal ini dikarenakan organisme tersebut mengalami tekanan yang sangat kuat sehingga terus-menerus memproduksi bahan aktif sebagai bentuk perlawanan atau pertahanan diri terhadap ancaman yang terjadi.

Brown Band disease atau yang biasa disingkat dengan BrB merupakan salah satu penyakit yang menginfeksi karang. Pada karang yang terinfeksi penyakit BrB di dalam polipnya ditemukan ciliata yang dijadikan sebagai penyebab timbulnya penyakit BrB (Lobban, 2011). Karang keras yang terinfeksi penyakit ini diduga mengeluarkan senyawa aktif dalam hal ini metabolit sekunder yang lebih besar begitupun dengan bakteri asosiasinya.

Bahan aktif yang terdapat pada organisme laut telah banyak dimanfaatkan sebagai antitumor atau antikanker. Terdapat banyak metode yang dapat dilakukan dalam menguji suatu senyawa untuk mengetahui apakah dapat menjadi antikanker atau antitumor, seperti BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*), *Lemna Assay* dan *Potato disc*. Namun diantara metode tersebut metode BSLT merupakan metode yang paling sering digunakan, sebab menurut Meyer (1982) BSLT merupakan metode yang sangat sederhana, ekonomis dan mudah didapatkan. Anderson (1992), juga menyarankan untuk menggunakan metode BSLT sebab

tingkat kepercayaan yang dihasilkan sangat tinggi sekitar 95% terhadap uji spesifik antikanker.

Oleh karena itu, penelitian ini akan menguji potensi sitotoksitas bahan aktif pada bakteri asosiasi karang yang terinfeksi penyakit BrB dari perairan Pulau Barrang Lompo, Kepulauan Spermonde, Kota Makassar, Sulawesi Selatan dengan menggunakan *Artemia salina* (*Brine Shrimp Lethality Test*) yang digunakan pada penapisan awal senyawa bioaktif bahan alam laut terhadap suatu uji spesifik antikanker.

Bahan dan Metode

Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada Bulan Mei sampai Oktober 2014 di Laboratorium Mikrobiologi Laut Jurusan Ilmu Kelautan Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan Universitas Hasanuddin, Makassar. Pengambilan sampel bakteri asosiasi pada karang yang terinfeksi BrB dilakukan di perairan Pulau Barranglompo, Kepulauan Spermonde, Makassar, Sulawesi Selatan.

Peremajaan Stok Bakteri dari Karang yang Terinfeksi Penyakit BrB

Stok bakteri yang akan diekstraksi terlebih dahulu diremajakan. Peremajaan dilakukan dengan menginokulasi bakteri dengan menggunakan jarum ose kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi medium TSB, lalu diinkubasi pada suhu 30 °C selama 2x24 jam. Bakteri yang telah tumbuh ditandai dengan keruhnya medium.

Selanjutnya bakteri diinokulasi pada medium TSA. Inokulasi pada medium TSA dilakukan dengan mengambil inokulum menggunakan jarum ose kemudian digoreskan di permukaan medium yang telah memadat lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam lalu dikultur pada medium TSB.

Ekstraksi

Ekstraksi bakteri asosiasi karang yang terinfeksi penyakit BrB dimulai dengan mengocok-ngocok bakteri menggunakan alat *shacker incubator* yang telah diremajakan selama 3 hari, kemudian hasil tersebut dimasukkan ke dalam botol lalu disentrifus selama 20 menit pada kecepatan 6000 rpm untuk memisahkan supernatan dan sel pada bakteri. Pemisahan yang telah terjadi, selanjutnya sel bakteri dicampurkan dengan aquades lalu disentrifus kembali agar menyatu, setelah itu hasil sel bakteri yang telah disentrifus dipindahkan ke wadah lain dan ditambahkan pelarut metanol lalu diuapkan. Begitupun untuk ekstraksi supernatan dilakukan dengan mencampurkan supernatan dengan pelarut Metanol 1:1, kemudian dimasukkan ke dalam labu ekstraksi lalu dikocok-kocok dan didiamkan selama 20 menit hingga terdapat 2 cairan yang terpisah. Hasil ekstraksi yang diolah selanjutnya adalah cairan pada bagian atas yang kemudian diuapkan hingga mendapatkan ekstrak kasar.

Uji Sitotoksitas

Uji sitotoksik dilakukan dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) berdasarkan Meyer (1982). Pada proses ekstrak supernatan atau sel diambil 10 mg, masing-masing dilarutkan dalam 1 ml pelarut (air laut dan DMSO 1%). Dibuat pengenceran 1000, 100, 10, ppm. Pengujian dilakukan dengan memasukkan 10 ekor larva *Artemia salina* berumur 24 jam ke dalam botol vial yang telah berisi larutan uji, setelah 24 jam, jumlah larva yang mati dihitung dengan bantuan alat kaca pembesar. Sebaiknya larva yang digunakan merupakan larva yang sehat dan baik dengan pengamatan visual seperti pergerakan yang aktif dan ukuran larva yang seragam.

Analisis Data

Senyawa aktif yang memiliki daya bioaktivitas tinggi dapat diketahui berdasarkan nilai *Lethal Concentration* 50% (LC_{50}), yaitu suatu nilai yang menunjukkan konsentrasi zat toksik yang dapat menyebabkan kematian hewan uji sampai 50%, untuk mendapatkan nilai

LC₅₀ terlebih dahulu harus menghitung nilai mortalitas hewan uji setelah 24 jam, dengan cara (Nurhayati, 2006)

$$\% \text{ mortalitas} = \frac{\text{Jumlah larva yang mati}}{\text{Jumlah larva Uji}} \times 100\%$$

Selanjutnya dengan mengetahui nilai persentase mortalitas yang didapatkan maka dilanjutkan dengan mencari LC₅₀ dengan program EPA Probit (Epa Program Analysis) versi 1,5 dan secara manual dengan rumus (Bado, 1993) ;

$$Y = m = \bar{X} + \frac{(5 - \bar{y})}{b}$$

Apabila pada kontrol ada larva yang mati, maka % kematian ditentukan dengan rumus Abbot (Meyer et al., 1982).

$$\% \text{ mortalitas} = \frac{T - K}{10} \times 100 \%$$

Keterangan :

T = Jumlah larva uji yang mati

K = Jumlah larva kontrol yang mati

10 = Jumlah larva uji

Hasil dan Pembahasan

Penelitian uji potensi sitotoksitas ini menggunakan ekstrak bakteri asosiasi karang *Acropora muricata* yang terinfeksi penyakit BrB (*Brown Band*), jenis bakteri asosiasinya adalah *Flavobacterium* sp. dan bakteri asosiasi dari karang sehat *Stylophora* sp. yaitu *Bacillus* sp. dan *Chromobacterium* sp. Pengujian ekstrak bakteri dilakukan dari bakteri asosiatif karang yang terinfeksi penyakit yang dianalogikan sebagai organisme yang tingkat stresnya lebih tinggi dibandingkan dengan karang sehat yang tingkat stresnya lebih rendah.

Berndasarkan hasil penelitian Massinai dkk., (2014), kedua bakteri yang berasosiasi dengan karang sehat (*Stylophora* sp.) yaitu *Bacillus* sp. dan *Chromobacterium* sp. memiliki aktivitas sebagai antibakteri terhadap bakteri patogen *Vibrio harveyi* dan *Aeromonas hydrophila* sedangkan bakteri asosiatif karang (*Acropora muricata*) yang terinfeksi penyakit yaitu *Flavobacterium* sp. pada uji pendahuluan didapatkan ekstrak bakteri tersebut memiliki aktifitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Streptococcus*.

Ekstrak bakteri asosiasi karang yang terinfeksi penyakit BrB *Flavobacterium* sp. memiliki tingkat toksik yang lebih tinggi dibandingkan dengan bakteri yang berasosiasi dengan karang sehat. Kemampuan mematikan larva *Artemia salina* dalam metode BSLT sangatlah tinggi, pada perlakuan pemberian ekstrak bakteri tersebut pada konsentrasi 100-1000 ppm membuat tingkat mortalitas larva *A. Salina* menjadi 100%, yang mengindikasikan bahwa senyawa aktif pada ekstrak bakteri tersebut memiliki potensi toksik, hal ini juga ditunjukkan dengan LC₅₀ pada ekstrak bakteri asosiasi karang (*Acropora muricata*) yang terinfeksi penyakit adalah 109 ppm dan lebih rendah dibandingkan dengan LC₅₀ pada ekstrak bakteri asosiasi karang sehat (Tabel 2).

Potensi sitotoksitas ekstrak bakteri asosiatif karang *Acropora muricata* yang terinfeksi penyakit BrB dan bakteri asosiatif karang sehat *Stylophora* sp. yang dapat berimplikasi pada uji spesifik seperti antikanker digunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) yang menggunakan hewan uji *Artemia salina*.

Tabel 2. Data Hasil Uji Potensi Sitotoksitas

Karang	Sampel	Kons (µg/ml)	Log kons	Ulangan 1		Ulangan 2		Ulangan 3		% Mortalitas	LC50 (ppm)			
				Mati	Hidup	Mati	Hidup	Mati	Hidup					
Karang Terinfeksi BrB (<i>Acropora muricata</i>)	<i>Flavobacterium sp.</i>	1000	3	10	0	10	0	10	0	100	109			
		100	2	3	7	1	9	0	10	13,3				
		10	1	0	10	0	10	0	10	0				
	<i>Bacillus sp.</i>	1000	3	9	1	9	1	10	0	96,7		183,7		
		100	2	1	9	0	10	0	10	3,3				
		10	1	4	6	2	8	0	10	20				
	Karang Sehat (<i>Stylophora sp.</i>)	<i>Chromobacterium sp.</i>	1000	3	4	6	5	5	4	6			43,3	4696,5
			100	2	0	10	2	8	2	8			13,3	
			10	1	1	9	2	8	2	8			16,7	

Tabel 2 menunjukkan nilai LC₅₀ yang didapatkan oleh masing-masing ekstrak berbeda, hal tersebut disebabkan oleh berbeda pula kandungan senyawa atau potensi dari bahan aktif masing-masing bakteri.

Tingginya tingkat sitotoksitas karang yang terinfeksi penyakit kemungkinan disebabkan karena karang tersebut memiliki stres yang lebih tinggi sehingga untuk mempertahankan diri organisme tersebut mengeluarkan senyawa aktif begitupun dengan bakteri asosiasi. Hal ini senada dengan yang dilaporkan oleh beberapa peneliti bahwa terdapat asosiasi mikroorganisme dengan organisme laut yang juga mensintesa senyawa aktif seperti organisme inangnya. Saat ini terdapat penelitian yang menyatakan bahwa bakteri tersebut memiliki senyawa aktif yang berpotensi sebagai antikanker namun belum diketahui jenis senyawa aktif yang berpotensi tersebut. Kumar *et al.*, (2014) menjelaskan bahwa *Flavobacterium sp.* yang berasosiasi dengan makroalga memiliki potensi tersebut (Tabel 1).

Karang keras yang sehat berjenis *Stylophora sp.* memiliki bakteri asosiasi berjenis *Bacillus sp.* dengan LC₅₀ < 1000 ppm yaitu 183,7 ppm. LC₅₀ ekstrak bakteri *Bacillus sp.* tergolong pada tingkat *low toxic* (daya racun) yang lemah sebab berada pada konsentrasi 100-1000 ppm berdasarkan klasifikasi Meyer, (1982). Terdapat penelitian yang menjelaskan bahwa *Bacillus sp.* memiliki potensi sitotoksitas sebagai antikanker yang dapat menghambat HCT-116 yang merupakan sel kanker kolorektal pada manusia (Kumar *et al.*, 2014). Selain itu terdapat penelitian yang menyatakan bahwa bakteri tersebut memiliki senyawa aktif sebagai bakterisin/antibakteri. *Bacillus sp.* yang merupakan salah satu bakteri yang mempunyai sifat yang lebih menguntungkan daripada mikroorganisme lain karena dapat bertahan hidup dalam waktu yang lama pada kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan untuk pertumbuhannya (Wong, 1994). Sebanyak 22 jenis *Bacillus* telah diidentifikasi diantaranya banyak ditemukan pada makanan. Beberapa kelompok bakteri ini menghasilkan metabolit sekunder yang dapat menekan pertumbuhan patogen (Backman *et al.* 1994).

Genus *Bacillus* digunakan sebagai agen biokontrol secara luas, menghasilkan zat antimikroba berupa bakteriosin. Bakteriosin adalah zat antimikroba polipeptida atau protein yang diproduksi oleh mikroorganisme yang bersifat bakterisida. Bakteriosin membunuh sel targetnya dengan menyisip pada membran target dan mengakibatkan fungsi membran sel menjadi tidak stabil sehingga menyebabkan sel lisis (Compant *et al.*, 2005). *Bacillus sp.* juga diketahui menghasilkan spora dan enzim kitinase yang mampu menghambat pertumbuhan jamur patogen yaitu *Aspergillus sp.* pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*) secara in vivo maupun in vitro (Malau, 2012). *Bacillus* juga menghasilkan enzim yang banyak digunakan dalam industri diantaranya Widyasti (2003), melaporkan *Bacillus spp.* penghasil enzim α -amilase yang banyak digunakan dalam industri untuk menghidrolisis ikatan α -1,4 glikosidik pati, glikogen dan substrat sejenisnya. Fuad *et al.*, (2004), melaporkan *Bacillus*

thermoglucosidasius AF-01 memproduksi parsial protease alkali yang memiliki sifat proteolitik yang cukup tinggi banyak digunakan pada industri detergen dan makanan.

Hasil uji sitotoksitas ekstrak bakteri *Chromobacterium* sp. yang juga merupakan bakteri asosiasi dari karang sehat (*Stylophora* sp.), diklasifikasikan sebagai senyawa yang tidak aktif dengan potensi sitotoksitas yang sangat rendah karena memiliki $LC_{50} > 1000$ ppm yaitu 4696,5 ppm.

Chromobacterium sp. yang merupakan Famili Rhizobiaceae merupakan jenis bakteri yang mengandung senyawa aktif yang dapat digunakan sebagai antibiotik untuk beberapa jenis bakteri patogen, selain itu Anderson *et al.*, (1974), menemukan metabolit yang diproduksi oleh bakteri tersebut yang mengandung *tetrabromopyrrole* namun senyawa yang digunakan sebagai antikanker belum ditemukan dalam ekstrak bakteri ini.

Berdasarkan hasil tersebut ekstrak bakteri asosiatif karang yang terinfeksi penyakit BrB (*Acropora muricata*) memiliki potensi sitotoksitas yang lebih besar, yang dapat berimplikasi pada uji spesifik seperti antikanker dibandingkan dengan bakteri asosiatif karang sehat.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini ditemukan ekstrak bakteri yang berasosiasi dengan karang sehat dan karang yang terinfeksi penyakit BrB memiliki potensi sitotoksik yang berbeda terhadap *Artemia salina* berdasarkan metode BSLT, namun ekstrak bakteri yang memiliki daya racun tertinggi berasal dari bakteri asosiatif karang (*Acropora muricata*) yang terinfeksi penyakit dengan nilai LC_{50} yang didapatkan <1000 ppm (109,9 ppm).

Daftar Pustaka

- Anderson, J., E. 1992. A Blind Comparison Of Simple Bench Top Bioassay And Human Tumor Cell Cytotoxicities As Antitumor Prescreens, Natural Product Chemistry. Elsevier. Amsterdam. Vol., 2, 107-111.
- Anderson, R., J., Wolfe, M., S. dan Faulkner, D., J. 1974. Autotoxic antibiotic production by a marine *Chromobacterium*. *Marine Biology*. 27 (4): 281-28
- Backman, P., A., Brannnen, P., M. Dan Mahaffe, W., F. 1994. Plant Respon and Disease Control Following Seed Inoculation with *Bacillus* sp. Di dalam: Ryder MH, Stephen PM, Bowen GD, editor. Improving Plant Production with *Rhizosphere Bacteria*. Australia: Pruc Third Int Work PGPR South Australia.
- Bado, A. 1993. Penentuan LC_{50} , LD_{50} , LI_{50} Bahan Beracun Berbahaya dengan Analisa Probit Terapan Statistik. Kursus. Analisis Limbah Industri Bagi Dosen Perguruan Tinggi Indonesia. Mipa. Unhas. Ujungpandang.
- Compant S., Duffy, B., Nowak, J., Clement, C. dan Barka, E., A. 2005. Mini review: Use Of Plant Growth – Promoting *Rhizobacteria* for Biocontrol Of Plant Diseases: Principles, Mechanism Of Action and Future Prospect. *Appl Environ Microbiol*. 71:4951-4959.
- Fuad, A., M., Rahmawati, R. dan Mubarik, N., R. 2004. Produksi dan Karekterisasi Parsial Protease Alkali Termostabil *Bacillus thermoglucosidasius* AF-01. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*. 9:29-35.
- Kumar, V., Roy, S. dan Borman, D. 2014. Bioactive Compounds From Algae And Bacteria In Marine Environment. http://aquafind.com/articles/Algae_&_Bacteria_In_Marine_Environment.php. [Diakses pada tanggal 15 November 2014].
- Lobban, S., C., Raymundo, M., L., dan Montagnes, S., J., D. 2011. Porpostoma Guamensis N. Sp., A Philasterine Scuticociliate Associated With Brown-Band Disease Of Corals. *Journal*. Pp 1-11.
- Malau, J. 2012. Kemampuan Bakteri Kitinolitik dalam Menghambat Infeksi *Aspergillus* sp. pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*). Skripsi. Medan: Sumatera Utara.
- Massinai, A., Werorilangi, S., Rastina dan Haris, A. 2014. Skrining Antimikroba Bakteri Asosiasi Karang Keras Sebagai Alternatif Pengendali Penyakit Karang Brown Band (BrB) dan Penyakit Organisme Budidaya. Laporan Hasil Peneliti Kompetensi Internal LP3M Unhas.

- Meyer, B., N., Ferrigni, N., R., Putman, J., E., Jacsben, L., B., Nicols, D., E., dan McLaughlin, J., L. 1982. Brine shrimp : a convinient general bioassay for Active Plant Constituents. Vol. 45, pp. 31-34
- Nurhayati, D., P., A., Abdulgani, N. dan Febrianto, R. 2006. Uji Toksisitas Ekstrak *Eucheuma alvarezii* terhadap *Artemia salina* sebagai Studi Pendahuluan Potensi Antikanker. Akta Kimindo. Vol 2.
- Widyasti, E. 2003. Isolasi *Bacillus* spp. Penghasil α -Amilase Ekstraseluler dan Penentuan Suhu Serta pH Optimum Pertumbuhan. Skripsi. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Wong, P., T., W. 1994. Bio-control of Wheat Take-All in the Field Using Soil Bacteria and Fungi. Di dalam: Ryder MH, Stephens PM, Bowen GP, editor. Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria. Australia: Pruc Third Int Work PGPR South Australia.